

Optimalisasi Produksi Steviosida dari Kalus Daun *Stevia rebaudiana* Bertoni dengan Variasi Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh

Optimization of Stevioside Production from Callus Derived from Stevia rebaudiana Bertoni Leaves with Variation of Plant Growth Regulators Combination

Aditya Fendy Heryanto¹, C. J. Soegihardjo², L.M. Ekawati Purwijantiningsih³
Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta
Jln. Babarsari No. 44, Yogyakarta 55281
fendyloe@yahoo.com

Abstrak

Steviosida merupakan salah satu metabolit sekunder dari tanaman *Stevia rebaudiana* yang digunakan sebagai pemanis alami non kalori. Steviosida memiliki rasa manis 300 kali dari sukrosa dan telah diuji tanpa efek samping. Kemampuan biji stevia untuk berkecambah sangat rendah dan perbanyakan secara vegetatif juga terbatas. Oleh karena itu, kultur *in vitro* digunakan untuk produksi metabolit sekunder. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi produksi steviosida dari kalus daun stevia yang diinduksi dengan 2,4-D 1 mg/l dan dipelihara dengan berbagai variasi kombinasi ZPT (2,4-D 0,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l + Kin 1 mg/l; NAA 0,1 mg/l + BAP 2 mg/l; NAA 2 mg/l; IBA 2 mg/l + BAP 2 mg/l dan 2,4-D 1 mg/l) pada medium ½ MS dan NP. Data kuantitatif yang diperoleh meliputi kecepatan waktu induksi kalus, persentase induksi kalus, indeks pertumbuhan kalus dan kandungan steviosida, sedangkan data kualitatif yang diperoleh meliputi morfologi kalus (warna dan tekstur kalus). Kandungan steviosida pada kalus diukur menggunakan kromatografi lapis tipis-densitometri dengan eluen aseton : etil asetat : air (5:4:1) sebagai fase geraknya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan kecepatan waktu induksi kalus pada medium ½MS dan NP. Jumlah kalus yang terinduksi mencapai 70,2% dengan tekstur kompak dan berwarna putih kekuningan. Harga Rf steviosida diperoleh antara 0,31 – 0,34 dengan λ maksimum 289 nm. Indeks pertumbuhan kalus tertinggi dan kadar steviosida tertinggi diperoleh dari kombinasi IBA 2 mg/l + BAP 2 mg/l. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa tidak adanya korelasi antara indeks pertumbuhan dengan kadar steviosida. Kadar steviosida pada daun stevia masih lebih tinggi dari kalus daun stevia.

Kata kunci : *Stevia rebaudiana*, steviosida, kalus, KLT-densitometri

Abstract

Stevioside is one of secondary metabolites from Stevia rebaudiana which has used widely as a non-caloric natural sweetener. Stevioside has 300 times sweeter than sucrose and have been tested without side effect. Stevia seeds show a very low germination and vegetative propagation is also limited. Therefore, in vitro culture can be used for secondary metabolites production. The aim of this research is to optimized stevioside production from callus derived from stevia leaves induced by 2,4-D 1 mg/l and maintained with variation of plant growth regulators combination (2,4-D 0,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l + Kin 1 mg/l; NAA 0,1 mg/l + BAP 2 mg/l; NAA 2 mg/l; IBA 2 mg/l + BAP 2 mg/l dan 2,4-D 1 mg/l) on ½MS and NP medium. Quantitative data obtained such as callus initiation, percentage of induction, growth index and stevioside content, while qualitative data obtained such as callus morphology (colour and

texture of callus). Stevioside content was evaluated through thin layer chromatography-densitometry with acetone : ethyl acetate : water (5:4:1) as mobile phase. Result showed that there was no difference of callus induction between ½MS and NP medium. Percentage of callus induction is about 70,2% with compact texture and creamy colour. Rf value of stevioside is between 0,31 – 0,34 with λ maximum 289 nm. Highest of callus growth index and stevioside content in callus shows from IBA 2 mg/l + BAP 2 mg/l combination. The result also show that there is no correlation between callus growth index and stevioside content. Stevioside content in stevia leaves still higher than callus derived from stevia leaves.

Key words : *Stevia rebaudiana, stevioside, callus, TLC-Densitometry*

PENDAHULUAN

Stevia (Stevia rebaudiana) merupakan salah satu jenis tanaman obat di Indonesia yang memiliki keunikan berupa rasa manis pada daunnya. Komponen utama yang memberikan rasa manis dan terkandung paling banyak pada daun stevia adalah steviosida (Daneshyar dkk., 2010), yang diperkirakan 300 kali lebih manis dari sukrosa (Geuns, 2008). Bahan pemanis ini telah digunakan di banyak negara sebagai pemanis alami non-kalori, sehingga dapat direkomendasikan untuk penderita diabetes mellitus tipe 2 dan penderita obesitas (Jagatheeswari dan Ranganathan, 2012). Penggunaannya juga telah diuji dan tidak memberikan efek samping (Megaji dkk., 2005 dalam Saikar dkk., 2009).

Potensi yang dimiliki oleh stevia menjadi perhatian banyak orang sehingga banyak pula keinginan untuk mengembangkan tanaman ini. Kemampuan biji stevia untuk berkecambah sangatlah rendah dan propagasi secara vegetatif juga terbatas dilakukan karena rendahnya jumlah individu yang dapat diperoleh dari satu tanaman induk (Saikar dkk., 2009 ; Janarthanam dkk., 2010). Oleh karena itu, kultur *in vitro* dapat menjadi alternatif dan sebagai sumber yang efisien untuk produksi metabolit sekunder (Janarthanam dkk., 2010).

Pada penelitian ini, medium kultur yang digunakan adalah medium ½ MS dan NP, sedangkan eksplan yang digunakan adalah bagian daun dari tanaman stevia yang masih muda. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui kombinasi ZPT yang optimum untuk menginduksi kalus dan untuk memproduksi steviosida dari eksplan daun pada medium MS.

Pada penelitian ini dilakukan dua tahap penelitian. Tahap pertama merupakan tahap induksi kalus daun stevia pada medium $\frac{1}{2}$ MS dan medium NP yang diberi hormon 2,4-D 1 mg/l. Tahap kedua merupakan tahap pemeliharaan kalus untuk produksi steviosida pada medium $\frac{1}{2}$ MS dan NP dengan variasi kombinasi ZPT.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilaksanakan pada bulan Desember 2013 sampai Mei 2014 di Laboratorium Teknobiologi-Industri, Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta. Tahap pengujian kualitatif dan kuantitatif steviosida dilakukan di Laboratorium Kimia Analisis Instrumen dan Laboratorium Farmakognosi-Fitokimia, Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma.

Alat-alat yang digunakan adalah erlenmeyer, botol kultur, botol *jam*, *petridish*, autoklaf, gelas ukur, gelas beker, pinset, skalpel, *blade*, bunsen, timbangan analitik, mikropipet, tip, pH meter, *hot plate magnetic stirrer*, *laminar air flow*, *aluminium foil*, kertas payung, karet gelang, kertas saring, *plastic wrap*, lumpang porselin, mortar, *vortex*, tabung reaksi, pipet ukur, propipet, pipet tetes, oven *Venticell*, termometer, rak kultur, plat KLT silika gel 60 F₂₅₄, *sprayer pompa*, *chamber*, *Camag Linomat V Applicator*, *Camag TLC Scanner 3*.

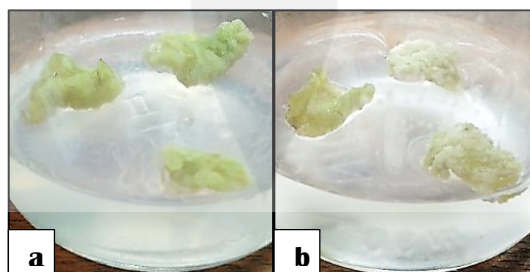
Bahan-bahan yang digunakan yaitu daun stevia dari tanaman *Stevia rebaudiana* yang diperoleh dari CV. Sky Central Surakarta, aquades, alkohol 70%, fungisida *Masalgin*, bakterisida *Agrept*, sabun cair, medium *Murashige and Skoog* (MS), medium *New Phalaenopsis* (NP), *agar bacteriological*, *Plant Preservative Mixture* (PPM), 2,4-D, IBA, NAA, BAP, Kinetin, larutan NaClO 20%, *tween 20*, metanol absolut, aseton, etil asetat, reagen *Liebermann-Burchard* dan steviosida 90% sebagai standar yang diberi oleh Prof. Jan M. C. Geuns (*Katholieke Universiteit Leuven*, Haverlee-Belgia).

Parameter yang diamati meliputi kecepatan waktu induksi kalus, persentase induksi kalus, indeks pertumbuhan kalus, morfologi kalus (warna dan tekstur kalus) dan kandungan steviosida baik secara kualitatif dan kuantitatif. Kadar steviosida pada kalus diukur pada minggu ke-6 setelah inokulasi menggunakan kromatografi lapis tipis-densitometri. Data kuantitatif berupa kecepatan waktu induksi kalus yang diperoleh dianalisis dengan uji t pada tingkat kepercayaan 95% untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang bermakna. Data kuantitatif berupa indeks pertumbuhan dan kadar steviosida yang diperoleh dianalisis dengan ANOVA pada tingkat kepercayaan 95% dan dilanjutkan dengan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) untuk mengetahui letak beda nyata antar perlakuan. Data kualitatif diperoleh berupa morfologi kalus yang meliputi warna dan tekstur kalus.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Inisiasi Kalus

Kalus merupakan suatu massa sel tidak berbentuk dan tidak terorganisasi yang terbentuk pada permukaan potongan jaringan yang terluka sebagai respon perlindungan untuk menutup jaringan yang terluka. Sebelum kalus terbentuk, terjadi tahap pelengkungan eksplan daun pada hari ke ± 5 , diikuti dengan munculnya kalus pada bagian permukaan eksplan daun pada hari ke ± 10 . Kalus yang tumbuh diinkubasi (Gambar 1) dan disubkultur ke medium perlakuan setelah tiga minggu



Gambar 1. Pertumbuhan Kalus Eksplan Daun Stevia Umur Tiga Minggu pada Medium Induksi (Dokumentasi pribadi, 2014)

Keterangan : a = medium $\frac{1}{2}$ MS 2,4-D 1 mg/l; b = medium NP 2,4-D 1 mg/l

B. Kecepatan Waktu Induksi Kalus

Induksi kalus pada eksplan daun stevia yang ditanam pada medium induksi dengan penambahan 2,4-D 1 mg/l terjadi pada hari ke 10 – 11 (Tabel 1) setelah penanaman eksplan. Hasil analisis uji t yang dilakukan menunjukkan kecepatan waktu induksi kalus yang tumbuh dari medium NP tidak berbeda nyata dengan medium $\frac{1}{2}$ MS. Hasil tersebut menunjukkan bahwa komposisi medium $\frac{1}{2}$ MS dan NP tidak mempengaruhi kecepatan waktu induksi kalus pada eksplan daun stevia. Secara umum, medium NP mirip dengan medium $\frac{1}{2}$ MS, perbedaan utama pada medium $\frac{1}{2}$ MS dan NP adalah komposisi penyusun makronutrien, kadar makro-mikro nutiren medium, serta kadar sukrosa.

Tabel 1. Kecepatan Waktu Induksi Kalus Eksplan Daun Stevia dengan ZPT 2,4-D 1 mg/l dengan Variasi Jenis Medium (hari)

ZPT Induksi	Ulangan	Jenis Medium	
		NP	$\frac{1}{2}$ MS
2,4-D 1 mg/l	1	11	10
	2	10	10
	3	10	10
	4	10	10
	5	10	10
	6	11	11
	7	10	11
	8	11	11
Rerata		10,375 ^A	10,375 ^A

Keterangan : angka pada baris yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna dari uji t pada tingkat kepercayaan 95%

C. Persentase Pertumbuhan Kalus

Kemampuan ZPT 2,4-D 1 mg/l yang digunakan untuk menginduksi kalus dari eksplan daun stevia dapat diketahui tingkat keberhasilannya dengan pengamatan presentase pertumbuhan kalus. Jumlah eksplan yang terinduksi diamati selama tiga minggu dan diperoleh persentase induksi kalus diperoleh sebesar 70,2 %. Eksplan diinduksi menggunakan hormon 2,4-D 1 mg/l karena menurut Machakova dkk. (2008), auksin yang paling umum digunakan untuk menginduksi kalus adalah 2,4-D. Penelitian Babu dkk. (2011) juga menunjukkan bahwa kalus dari eksplan daun stevia yang tumbuh dari medium

MS dengan 2,4-D 1 mg/l mampu menunjukkan kemampuan induksi kalus yang lebih baik dengan respon induksi $75 \pm 5 \%$ (Janarthanam dkk., 2010).

D. Indeks Pertumbuhan

Indeks pertumbuhan kalus merupakan parameter pertumbuhan kalus yang berdasarkan pada berat basah kalus. Kalus umur tiga minggu yang tumbuh di medium induksi disubkultur ke medium perlakuan dengan berbagai kombinasi hormon yaitu 2,4-D 0,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l + Kin 1 mg/l, NAA 0,1 mg/l + BAP 2 mg/l, NAA 2 mg/l, IBA 2 mg/l + BAP 2 mg/l dan kontrol 2,4-D 1 mg/l. Hasil pengamatan indeks pertumbuhan kalus dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Indeks Pertumbuhan (%) Kalus Eksplan Daun Stevia Minggu ke-6 pada Medium $\frac{1}{2}$ MS dan NP dengan Variasi Kombinasi ZPT

Jenis Medium	Kombinasi ZPT Optimum				Kontrol 1 mg/l 2,4-D (E)	Rerata
	0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l NAA + 1 mg/l Kin (A)	0,1 mg/l NAA + 2 mg/l BAP (B)	2 mg/l NAA (C)	2 mg/l IBA + 2 mg/l BAP (D)		
NP	215,766 ^{bc}	198,24 ^{bc}	88,1961 ^a	262,984 ^c	110,546 ^{ab}	175,147 ^A
$\frac{1}{2}$ MS	109,968 ^{ab}	188,294 ^{abc}	213,288 ^{bc}	286,292 ^c	181,627 ^{abc}	195,894 ^A
Rerata	162,867 ^A	193,267 ^A	150,742 ^A	274,638 ^B	146,087 ^A	

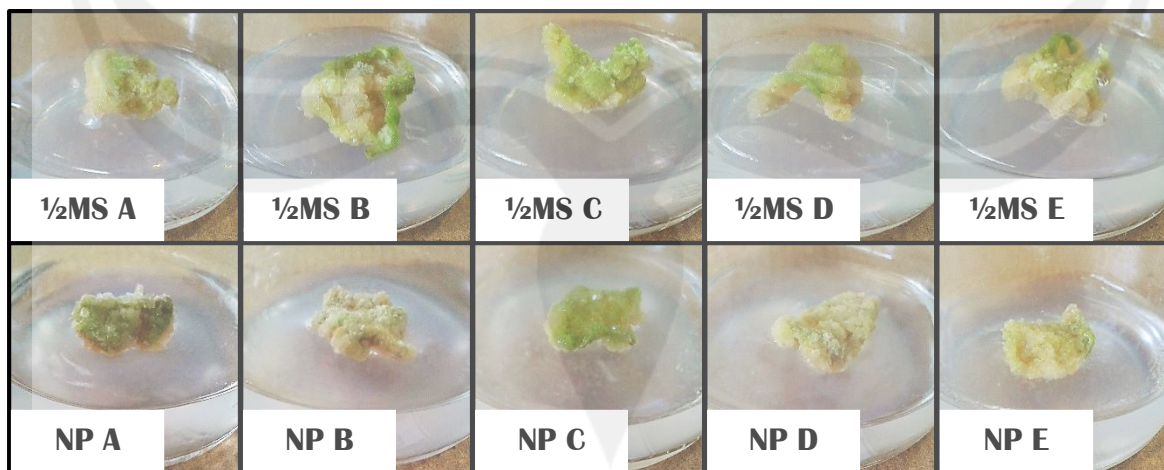
Keterangan : angka pada baris dan kolom yang sama diikuti dengan huruf berbeda menunjukkan adanya beda nyata pada tingkat kepercayaan 95%

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa adanya perbedaan nyata pada variasi kombinasi ZPT terhadap rerata indeks pertumbuhan kalus, tetapi tidak ada perbedaan nyata pada variasi jenis medium terhadap indeks pertumbuhan. Rerata indeks pertumbuhan kalus pada medium perlakuan (A – D) lebih besar daripada indeks pertumbuhan kalus pada medium kontrol (E). Data rerata indeks pertumbuhan menunjukkan bahwa medium perlakuan dengan penambahan IBA 2 mg/l + BAP 2 mg/l memberikan rerata indeks pertumbuhan terbesar yaitu 274,638 %.

Interaksi antara medium MS dan NP dengan kombinasi ZPT IBA 2 mg/l + BAP 2 mg/l juga menunjukkan adanya beda nyata dengan menghasilkan indeks pertumbuhan yang lebih besar dibandingkan indeks pertumbuhan dengan kombinasi ZPT lainnya. Menurut Payghamzadeh dan Kazemitabar (2010), BAP dan IBA memiliki efek yang sinergis dalam pembentukan kalus dan berat basah kalus. Hal serupa juga diungkapkan oleh Mohajer dkk. (2012) dalam penelitiannya yang menggunakan kombinasi NAA, BAP dan IBA pada medium MS dan diperoleh kombinasi 2 mg/l BAP dan 1 mg/l IBA memberikan berat basah kalus tertinggi dari eksplan daun Sainfoin (*Onobrychis sativa*).

E. Morfologi Kalus

Hasil pengamatan tekstur kalus pada semua perlakuan yaitu, kalus memiliki tekstur kompak dengan warna yang mendominasi adalah warna putih kekuningan (Gambar 2). Menurut Lizawati (2012), warna putih atau kekuningan menunjukkan ciri kalus yang embrionik. Selain genotipe eksplan dan ZPT endogen, perkembangan dan tekstur kalus juga dipengaruhi oleh jenis dan konsentrasi ZPT, komposisi nutrisi medium dan kondisi lingkungan kultur.



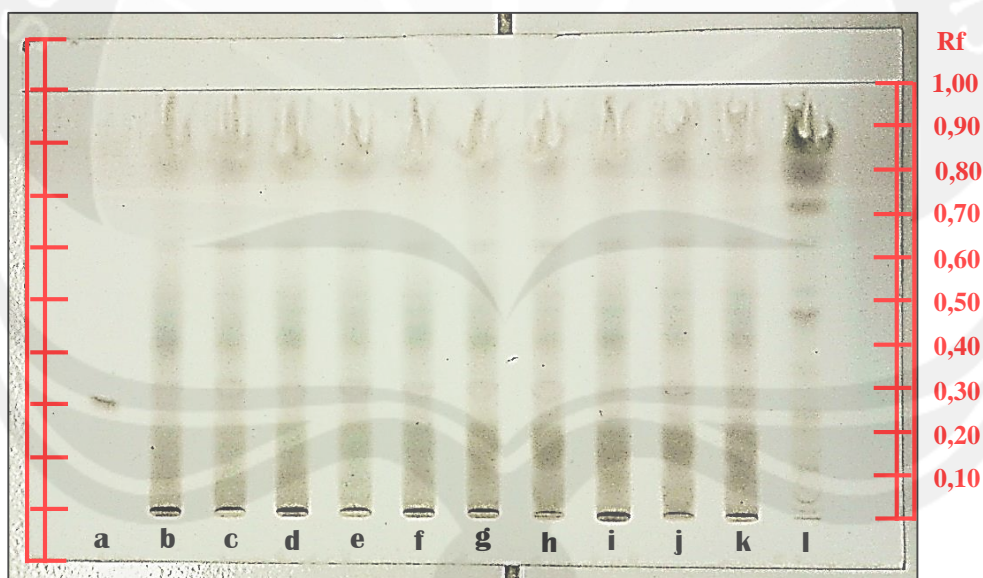
Gambar 2. Perbandingan Morfologi Kalus Eksplan Daun Stevia yang Ditumbuhkan pada Medium $\frac{1}{2}$ MS dan NP dengan Variasi Kombinasi ZPT pada Minggu ke-6 (Dokumentasi Pribadi, 2014)

Keterangan : A = 2,4-D 0,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l + Kin 1 mg/l; B = NAA 0,1 mg/l + BAP 2 mg/l; C = NAA 1 mg/l; D = IBA 2 mg/l + BAP 2 mg/l; E = 2,4-D 1 mg/l

F. Kandungan Steviosida

Parameter ini bertujuan untuk menentukan kandungan steviosida baik secara kualitatif maupun kuantitatif dari kalus daun stevia. Kalus daun stevia umur 6 minggu dikeringkan menggunakan oven dan digiling sebelum diekstrak. Kalus kering kemudian diekstraksi menggunakan pelarut metanol dengan metode *cold finger* yang menggunakan prinsip refluks. Ekstrak kemudian digunakan untuk uji kualitatif menggunakan metode KLT dan dilanjutkan untuk uji kuantitatif menggunakan metode densitometri (*TLC Scanner*).

Hasil pengujian kualitatif steviosida diperoleh dengan adanya bercak steviosida pada ekstrak kalus yang sejajar dengan bercak steviosida standar. Deteksi bercak steviosida dilakukan dengan penyemprotan menggunakan pereaksi semprot *Liebermann-Burchard*. Hasil uji kualitatif berupa bercak steviosida dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Pengujian Kualitatif Ekstrak Kalus Daun Stevia (Dokumentasi Pribadi, 2014)

Keterangan : a = standar steviosida; b = kalus $\frac{1}{2}$ MS A; c = kalus $\frac{1}{2}$ MS B; d = kalus $\frac{1}{2}$ MS C; e = kalus $\frac{1}{2}$ MS D; f = kalus $\frac{1}{2}$ MS E; g = kalus NP A; h = kalus NP B; i = kalus NP C; j = kalus NP D; k = kalus NP E; l = daun stevia; fase diam = plat silika gel F254; fase gerak = aseton-etil asetat-air (5:4:1); deteksi = reagen semprot *Liebermann-Burchard* (LB)

Warna bercak steviosida yang nampak adalah coklat keabu-abuan dengan harga Rf standar 0,31, harga Rf ekstrak kalus daun stevia berkisar antara 0,31 – 0,34 dan harga Rf ekstrak daun stevia 0,31. Harga Rf yang diperoleh juga sesuai dengan penelitian Chester dkk. (2012)

yaitu $0,31 \pm 0,02$. Bercak steviosida kemudian diukur kadarnya dengan mencari λ maksimum dari 200 nm – 500 nm dan diperoleh ± 289 nm.

Pengujian kuantitatif kandungan pada kalus daun stevia dihitung menggunakan persamaan regresi $Y = 19,85x + 152,25$ dengan nilai $R^2 = 0,997$. Persamaan regresi diperoleh dari luas area kromatogram standar steviosida dengan seri 5, 25, 50, 75 dan 100 μ g. Luas area bercak steviosida dari kalus daun stevia diukur dan dihitung menggunakan persamaan regresi yang diperoleh. Hasil kadar steviosida dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Kadar Steviosida (μ g) Kalus Eksplan Daun Stevia Minggu ke-6 pada Medium $\frac{1}{2}$ MS dan NP dengan Variasi Kombinasi ZPT

Jenis Medium	Kombinasi ZPT Optimum				Kontrol 1 mg/l 2,4-D (E)	Rerata
	0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l NAA + 1 mg/l Kin (A)	0,1 mg/l NAA + 2 mg/l BAP (B)	2 mg/l NAA (C)	2 mg/l IBA + 2 mg/l BAP (D)		
NP	3,733 ^a	7,763 ^a	6,062 ^a	24,418 ^a	0,421 ^a	8,479 ^A
$\frac{1}{2}$ MS	12,243 ^a	12,876 ^a	7,657 ^a	14,656 ^a	7,599 ^a	11,006 ^A
Rerata	7,988 ^A	10,320 ^A	6,859 ^A	19,537 ^B	4,010 ^A	

Keterangan : angka pada baris dan kolom yang sama diikuti dengan huruf berbeda menunjukkan adanya beda nyata pada tingkat kepercayaan 95%

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa adanya perbedaan nyata pada variasi kombinasi ZPT terhadap rerata kadar steviosida, tetapi tidak ada perbedaan nyata pada variasi jenis medium dan interaksi jenis medium–kombinasi ZPT terhadap kadar steviosida. Rerata kadar steviosida kalus pada medium perlakuan (A – D) lebih besar daripada kadar steviosida kalus pada medium kontrol (E). Data rerata kadar steviosida menunjukkan bahwa medium perlakuan dengan penambahan IBA 2 mg/l + BAP 2 mg/l memberikan rerata kadar steviosida terbesar yaitu 19,537 μ g.

Kombinasi IBA dan BAP merupakan kombinasi auksin dan sitokinin yang mampu memberikan kadar steviosida tertinggi. Menurut Staden dkk., (2008), biosintesis dari sitokinin melibatkan jalur MEP dan MVA, dimana jalur MEP juga merupakan jalur biosintesis

steviosida (Brandle dan Telmer, 2007). Osbourn dan Lanzotti (2009) juga mengungkapkan bahwa tahap awal proses biosintesis steviosida terjadi di plastida, yaitu kloroplas. Sitokinin pada penelitian ini menjadi unsur yang penting karena sitokinin juga berperan pematangan kloroplas (Staden dkk., 2008).

Perlakuan kontrol dengan penambahan 2,4-D 1 mg/l juga menunjukkan rerata yang terendah untuk parameter kadar steviosida. Machakova dkk. (2008) juga mengungkapkan bahwa 2,4-D pada medium dapat mengurangi pembentukan klorofil pada kultur kalus. Oleh karena itu, penggunaan kombinasi auksin dan sitokinin lebih dianjurkan untuk induksi kalus maupun pemeliharaan kalus karena sitokinin mampu mendorong pembentukan klorofil, sedangkan auksin dapat menghambatnya.

Rerata dari kedua parameter yang diperoleh dilanjutkan dengan uji korelasi untuk melihat ada tidaknya hubungan antara indeks pertumbuhan dan kadar steviosida. Hasil analisis menunjukkan tidak adanya korelasi yang signifikan antara indeks pertumbuhan dan kadar steviosida, sehingga dapat dikatakan bahwa kadar steviosida tidak dipengaruhi oleh indeks pertumbuhan kalus. Hasil ini tidak sesuai dengan pola rerata indeks pertumbuhan dan kadar steviosida yang diperoleh dari variasi ZPT sebelumnya. Hal tersebut dimungkinkan karena faktor yang mempengaruhi kandungan steviosida tidak hanya biomassa kalus dan pertumbuhannya. Faktor lain seperti fotoperiod dapat mempengaruhi pembentukan klorofil, sedangkan pada penelitian ini tidak dilakukan fotoperiod.

Kadar steviosida pada daun juga diukur sebagai pembanding dan diperoleh sebesar 146,221 µg. Kadar steviosida yang terukur pada kalus jauh lebih kecil daripada di daun. Hasil tersebut juga menunjukkan bahwa belum optimalnya produksi steviosida pada kalus jika dibandingkan pada daun stevia.

Upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan produksi steviosida dari kalus daun stevia yaitu dengan mengoptimasi kombinasi ZPT menggunakan auksin dan sitokinin. Selain

itu, penambahan prekursor seperti GA₃ juga dapat dilakukan karena steviosida memiliki jalur biosintesis yang sama dengan GA₃. Modi dkk. (2011) juga melaporkan hasil penelitiannya bahwa penyemprotan GA₃ pada tanaman stevia *ex vitro* mampu meningkatkan kandungan steviosida secara signifikan.

SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa : (1) Tidak ada perbedaan kecepatan waktu induksi kalus pada medium ½MS dan NP yang diinduksi oleh 2,4-D 1 mg/l. (2) Indeks pertumbuhan kalus terbesar diperoleh dari kombinasi hormon IBA 2 mg/l + BAP 2 mg/l, baik pada medium ½MS maupun NP. (3) Kadar steviosida terbesar diperoleh dari kombinasi hormon IBA 2 mg/l + BAP 2 mg/l, baik pada medium ½MS maupun NP.

B. Saran

(1) Waktu kontak atau konsentrasi larutan fungisida pada metode sterilisasi eksplan perlu ditingkatkan untuk mengurangi kontaminasi yang didominasi oleh jamur. (2) Perlu dilakukan optimalisasi kombinasi ZPT yang digunakan untuk induksi kalus maupun pemeliharaan kalus. Penggunaan auksin tunggal seperti 2,4-D saja sebaiknya tidak dilakukan, melainkan dikombinasi dengan sitokinin. (3) Perlu diteliti ada tidaknya pengaruh dari penambahan prekursor seperti GA₃ untuk meningkatkan produksi steviosida pada kalus. (4) Perlu adanya pengaturan fotoperiod selama inkubasi kultur kalus.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Prof. C.J. Soegihardjo, Apt. dan L.M. Ekawati Purwijantiningsih, S.Si., M.Si. untuk bimbingannya, juga kepada Prof. Jan. M. C. Geuns untuk steviosida standar yang diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Babu, P., Chikkasubbanna, V., Prasad, T. G. and Radhakrishna, D. 2011. In vitro studies on the bearing ability of Stevia for stevioside biosynthesis. *Biosci. Biotech. Res. Comm.*, 4(1) : 19 – 22.
- Brandle, J. E. and Telmer, P. G. 2007. Steviol Glycoside Biosynthesis. *Phytochemistry*, 68 : 1855 – 1863.
- Chester K., Tamboli, E. T., Singh, M. and Ahmad, S. 2012. Simultaneous Quantification of Stevioside and Rebaudioside A in Different Stevia Samples Collected from Indian Subcontinent. *J. Pharm. Bioall. Sci.*, 4(4) : 276 – 281.
- Daneshyar, M., Genus, J. M. C., Buyse, J. G. , Kermanshahi, H., Willemsen, H., Ansari, Z., Decuyper, E. and Everaert, N. 2010. Evaluation of Steviol Injection on Chicken Embryos : Effects on Post-hatch Development, Proportional Organ Weight, Plasma Thyroid Hormones and Metabolites. *J. Poult. Sci.*, 47 : 71 – 76.
- Geuns, J. M. C. 2008. Stevioside : A Safe Sweetener and Possible New Drug for the Treatment of Metabolic Syndrome. In : Weerasinghe, D. K. and Dubois, G. (eds.). *ACS Symposium Series 979* : 596 – 614.
- Jagatheeswari, D. and Ranganathan, P. 2012. Studies on Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bert. *Int. J. Pharm. Biol. Arch.*, 3(2) : 325 – 320.
- Janarthanam, B., Gopalakrishnan, M. And Sekar, T. 2010. Secondary Metabolite Production in Callus Cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.*, 45(3) : 243 – 248.
- Lizawati. 2012. Induksi Kalus Embriogenik dari Eksplan Tunas Apikal Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) dengan Penggunaan 2,4-D dan TDZ. *Jurnal Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Jambi*, 1(2) : 75 – 87.
- Machakova, I., Zazimalova, E. and George, E.F. 2008. Plant Growth Regulators I : Introduction; Auxin, Their Analogues and Inhibitors. In : George, E. F., Hall, M. A. and de Klerk, G-J. (eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Third Edition Volume 1, p. 175. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Modi, A. R., Shukla, Y. M., Litoriya, N. S., Patel, N. J. and Narayan, S. 2011. Effect of Gibberellic Acid Foliar Spray on Growth Parameters and Stevioside Content of Ex Vitro Grown Plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Medicinal Plants*, 3(2) : 157 – 160.
- Mohajer, S., Taha, R. M., Khorasani, A. and Yaacob, J. S. 2012. Induction of Different Types of Callus and Embryogenesis in Various Explant of Sainfoin (*Onobrychis sativa*). *Aust. J. Crop Sci.*, 6(8) : 1305 – 1313.
- Osborn, A. E. and Lanzotti, V. 2009. *Plant-derived Natural Products : Synthesis, Function, and Application*. Springer, New York.
- Payghamzadeh, K. and Kazemitabar, S.K. 2010. The Effect of BAP, IBA and Genotypes on In Vitro germination of Immature Walnut Embryos. *Int. J. Plant Prod.*, 4(4) : 309 – 322.

- Sairkar, P. Chandravanshi, M. K., Shukla, N. P. and Mehrotra, N. N. 2009. Mass Production of An Economically Important Medicinal Plant *Stevia rebaudiana* using *in vitro* propagation techniques. *J. Med. Plant Res.*, 3(4) : 266 – 270.
- Staden, J. V., Zazimalova, E. and George, E. F. 2008. Plant Growth Regulators II : Cytokinins, their Analogues and Antagonists. In : George, E. F., Hall, M. A. and de Klerk, G-J. (eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Third Edition Volume 1, p. 65. Springer, Dordrecht, The Netherland.

